

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	太田 雄
<p>学位論文題目</p> <p>Extracellular vesicle-encapsulated miR-30e suppresses cholangiocarcinoma cell invasion and migration via inhibiting epithelial-mesenchymal transition</p> <p>(Mir-30eは細胞外小胞EVによる細胞間伝達を介し上皮間葉形質転換EMTの 抑制を経て胆管癌細胞の浸潤・遊走能を阻害する)</p> <p>共著者名</p> <p>高橋 賢治、大竹 晋、玉木 陽穂、岡田 充巧、麻生 和信、牧野 雄一、 藤井 聡、太田 嗣人、羽田 勝計</p> <p>Oncotarget, 2018, Vol. 9, (No. 23) , pp:16400-16417</p> <p>研究目的</p> <p>胆管癌は予後不良な癌腫の一つであり、その主な原因となる局所浸潤、遠隔転移機構の解明は喫緊の課題である。上皮間葉形質転換(Epithelial-Mesenchymal Transition、EMT)は上皮細胞が細胞接着能や極性を失い、間葉系細胞へと形質転換する現象である。近年、EMTが癌における浸潤、転移機構に深く関わるということが報告されている。MicroRNA(miRNA)は標的遺伝子の3'非翻訳領域(3'UTR)に相補的に結合し、遺伝子の発現及び機能抑制を行う^[1]。様々な癌腫において、miRNAによるEMT制御機構が報告されているものの、胆管癌におけるEMT制御に関わるmiRNAの報告は依然として数少ない^[2]。一方、miRNAの細胞間情報伝達媒体として細胞外小胞(Extracellular vesicles、EVs)が注目されている。EVsが含有するRNAやタンパクなどの情報は、EVs分泌細胞(ドナー細胞)から隣接細胞(レシピエント細胞)へと運搬され、レシピエント細胞内におけるシグナル伝達や細胞形態に影響を与える^[3]。しかし胆管癌において、EVsによるmiRNAの細胞間伝達機構がEMTに与える影響は不明である。本研究の目的は、胆管癌におけるEMTを制御する新規miRNAを同定し、その制御機構を解析し、さらにEVsによるmiRNAの情報伝達機構が胆管癌細胞の浸潤、遊走能に与える影響について検証することである。</p> <p>材料・方法</p> <p>EMTを促進するサイトカインであるTGF-βを投与し、胆管癌細胞株においてEMTを誘導した。EMTを誘導した胆管癌細胞におけるmiRNAの発現変化を、miRNAマイクロアレイにて解析した。EMT誘導下で発現低下するmiRNA群のうち、EMT促進転写因子Snailを標的分子とし、その発現と機能を抑制することが想定されるmiRNAをバイオインフォマティクス解析により同定した。</p>			

さらに、Snail 3'UTRクローンを用いたレポーターアッセイにてmiRNAの機能抑制効果を実証した。

正常胆管上皮細胞株(MMNK-1)を対照とし、5種類の胆管癌細胞株(HuCCT1、HuH28、OZ、TFK1、RBE)における、同定したmiRNAの発現変化を解析した。

同定したmiRNAが胆管癌細胞株におけるEMT、浸潤、遊走能に及ぼす影響について形態学的、遺伝子発現の両面から強制発現法と機能阻害法を用い検討した。Snail及び上皮、間葉系マーカーに与える影響をreal-time PCR法、Western blot法で解析した。細胞増殖、生存、浸潤、遊走能の変化はcell counting、MTS assay、cell wound healing assay、Transwell assayを用いて解析した。また、miRNAを強制発現させた胆管癌細胞株よりEVsを抽出した。これらのEVsには、同定したmiRNAが高発現しており、各miRNAがEVsによる細胞間輸送に伴いレシピエント細胞へと伝達されることを確認した。伝達されたmiRNAが、レシピエント細胞における形態、遺伝子発現に与える影響を上記と同様の方法にて解析した。

成 績

TGF- β が胆管癌細胞におけるEMTを誘導するかを検証するために、HuCCT1、RBEに対しTGF- β を投与し、細胞形態、EMT関連遺伝子の変化について検討した。TGF- β 投与により、胆管癌細胞は紡錘形の形状を示し、間葉系細胞の形態的特徴を呈した。また、TGF- β 投与下で上皮系マーカー(E-cadherin)の発現は低下し、EMT促進転写因子Snail及び間葉系マーカー(N-cadherin、Vimentin)の発現は上昇した。以上の結果より、TGF- β 投与によって胆管癌細胞株にEMTが誘導されることを確認した。

HuCCT1を用いて、TGF- β 投与によりEMTを誘導した群と非投与対照群におけるmiRNA2555種類の発現変化を、マイクロアレイを用い網羅的に解析した。対照群に対し、EMT誘導群で0.67倍以下に発現低下する56種類のmiRNAを抽出した。Target Scanを用いたバイオインフォマティクス解析を用い、発現低下群の中からmiR-30eがSnailを標的とすることを予測した。さらに、ルシフェラーゼ発現遺伝子の下流にmiR-30eの相補的結合部位を含むSnail 3'UTR配列を挿入したレポータープラスミドをHuCCT1、RBEに導入し、miR-30eを強制発現によるルシフェラーゼ活性の有意な低下を認めた。従って、miR-30eはSnailを直接の標的とし、その発現、活性を低下させた。また、miR-30eは正常胆管上皮細胞に対し、全ての胆管癌細胞株において発現低下し、TGF- β 投与によりその発現は更に低下した。

次に、miR-30eによるEMT制御機構を解明するために、HuCCT1、RBEに対しmiRNA mimicを用いmiR-30eを強制発現し、EMT関連遺伝子及び細胞増殖能などの変化を検討した。MiR-30eの強制発現によって、E-cadherinはmRNA、タンパク発現共に増加し、Snail、N-cadherin、Vimentinの発現は減少した。さらにmiR-30e強制発現下における胆管癌細胞増殖、生存、浸潤並びに遊走能は全て有意に減弱した。

miRNA inhibitorを用いてmiR-30eの機能阻害を行ったところ、E-cadherinはmRNA、タンパク発現共に低下し、一方、Snail、N-cadherin、VimentinのmRNA、タンパク発現は増加した。さらにmiR-30eの機能阻害下における細胞増殖、生存、浸潤並びに遊走能は全て有意に増加した。これらの結果から、miR-30eは胆管癌におけるEMT抑制を介し、浸潤、遊走能を減弱する癌抑制性miRNAであることが示唆された。

最後に、miR-30eが細胞外小胞EVsによって細胞間伝達され、伝達先細胞においてもEMTの制御に関与するかを検討した。胆管癌細胞株より超遠心法を用いて抽出したEVsは、電子顕微鏡下で、脂質二重膜を有する約100nmの小胞体であることを確認した。MiRNA mimic導入によりmiR-30eを強制発現させたHuCCT1(ドナー細胞)から抽出したEVs中には、miR-30eが高発現した。これらのEVsを添加したレシピエント細胞においてもmiR-30eの発現が増強しており、miR-30eはEVsによって細胞間伝達されるmiRNAであることが明らかとなった。また、細胞間伝達されたmiR-30eは、レシピエント細胞においてEMT抑制を経て、増殖、生存、浸潤並びに遊走能を有意に減弱した。以上、miR-30eは胆管癌細胞から分泌されるEVsによって細胞間輸送され、レシピエント細胞におけるEMTや浸潤、遊走能を制御する。

考 案

MiR-30eを含むmiR-30 family(miR-30a, b, c, d, e)は種々の癌腫においてEMTを抑制する事が報告されている。様々な要因でmiR-30 familyの発現が低下することにより、EMT抑制機序が破綻する。胆管癌においては、miR-200cとmiR-214がEMTを抑制することが報告されているものの、EVsを介したmiRNAの細胞間伝達機構がEMTに与える影響については不明である[2]。

本研究ではmiR-30eが胆管癌細胞から分泌されるEVsによって細胞間輸送され、Snailを標的としてEMTを抑制し、胆管癌細胞の浸潤、遊走能を抑制するmiRNAであることを初めて明らかにした。胆管癌細胞が分泌するEVs中には様々な腫瘍由来因子が含まれているが、miR-30eを豊富に含有するEVsがレシピエント細胞のEMTを有意に抑制した結果から、miR-30eはEVsによって細胞間伝達され、癌抑制性に機能するmiRNAであると考えられた。

今回、胆管癌におけるmiR-30eの発現低下が浸潤、転移に関わるEMT制御の破綻に関わることを明らかにした。胆管癌の悪性度や予後を規定し得るmiR-30eは、EVsを介して人為的に制御が可能であり、胆管癌の新たな治療標的としての有用性が期待される。

結 論

- 1) 胆管癌細胞においてmiR-30eはSnailを標的としてEMTを抑制し、浸潤、遊走能を減弱させる癌抑制性miRNAである。
- 2) MiR-30eは胆管癌細胞由来のEVsによって細胞間伝達され、伝達先細胞におけるEMT制御に関わる。

引 用 文 献

(重要な引用文献3編以内を掲載すること。)

1. Takahashi K, Yan I, Wen HJ, Patel T. microRNAs in liver disease: from diagnostics to therapeutics. *Clin Biochem.* 2013; 46:946-52.
2. Haga H, Yan I, Takahashi K, Wood J, Patel T. Emerging insights into the role of microRNAs in the pathogenesis of cholangiocarcinoma. *Gene Expr.* 2014; 16:93-9.
3. Kogure T, Lin WL, Yan IK, Braconi C, Patel T. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology.* 2011; 54:1237-48.

参 考 論 文

(参考論文5編以内を掲載すること。)

1. Takahashi K, Yan IK, Haga H, Patel T. Modulation of hypoxia-signaling pathways by extracellular linc-RoR. *J Cell Sci.* 2014; 127:1585-94.
2. Takahashi K, Yan IK, Wood J, Haga H, Patel T. Involvement of extracellular vesicle long noncoding RNA (linc-VLDLR) in tumor cell responses to chemotherapy. *Mol Cancer Res.* 2014; 12:1377-87.
3. Ota Y, Aso K, Watanabe K, Einama T, Imai K, Karasaki H, Sudo R, Tamaki Y, Okada M, Tokusashi Y, Kono T, Miyokawa N, Haneda M, Taniguchi M, Furukawa H. Hepatic schwannoma: imaging findings on CT, MRI and contrast-enhanced ultrasonography. *World J Gastroenterol.* 2012; 18:4967-72.
4. Einama T, Uchida K, Taniguchi M, Ota Y, Watanabe K, Imai K, Karasaki H, Chiba A, Oikawa K, Miyokawa N, Furukawa H. Successful curative resection of gallbladder cancer following S-1 chemotherapy: A case report and review of the literature. *Oncol Lett.* 2014; 8:2443-47.
5. Takahashi K, Yan I, Haga H, Patel T. Long noncoding RNA in liver diseases. *Hepatology.* 2014; 60:744-53.

平成 31 年 2 月 12 日

大学院博士課程委員会委員長 殿

審査委員長

吉川 博之



学位論文審査結果の報告について

太田 雄 氏提出の学位論文審査及び学力の確認を終了しましたので、
下記により提出します。

記

1. 学位論文の要旨 (3, 000字以内)
2. 学位論文の審査結果の要旨 (800字以内) 1部
3. 学力確認の結果

審査委員長

吉川 博之

適 否



審査委員

奥 村 利 博

適 否



審査委員

西川 浩 司

適 否



学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	太 田 雄
審査委員長 <u>古川博之</u> (適・否) (印)			
審査委員 <u>興村和哉</u> (適・否) (印)			
審査委員 <u>西川祐司</u> (適・否) (印)			
学 位 論 文 題 目			
Extracellular vesicle-encapsulated miR-30e suppresses cholangiocarcinoma cell invasion and migration via inhibiting epithelial-mesenchymal transition (miR-30e は細胞外小胞 EVs による細胞間伝達を介し上皮間葉形質転換 EMT の抑制を経て胆管癌細胞の浸潤・遊走能を阻害する) 掲載雑誌: Oncotarget,2018,vol.9,(No.23),pp16400-16417			
(審査評価・結果のみとし、800字以内で提出すること。)			
申請者は、胆管癌において、細胞外小胞 (EVs) を介した miRNA の細胞間伝達機構が上皮間葉形質転換 (EMT) に与える影響を解明すべく実験を行った。			
申請者は、TGF-β 投与によって胆管癌細胞に EMT が誘導されることを確認した後、EMT 抑制に関与する Snail を直接標的として最もこれに関連すると考えられる miRNA として miR-30e を抽出した。実際、miR-30e は、Snail を直接標的として、その発現、活性を低下させることが確認されたと同時に、miR-30e がすべての胆管癌細胞株において発現低下していることが実証された。また、miR-30e は、強制発現によって、胆管癌における EMT を抑制する一方、阻害によって EMT を促進することから、EMT を介して、浸潤、遊走能を減弱する癌抑制 miRNA であることが示めされた。さらに、miR-30e は胆管癌細胞から分泌される EVs によって細胞間輸送されることが明らかとなり、レシピエント細胞における EMT や、浸潤、遊走能を抑制することも判明した。			
本研究で、申請者は、miR-30e が胆管癌細胞から分泌される EVs によって細胞間輸送され、Snail を標的として EMT を抑制し、胆管癌細胞の浸潤、遊走能を抑制する miRNA であることを初めて明らかにした。今回、胆管癌における miR-30e の発現低下が浸潤、転移に関わる EMT 抑制の破綻に関わることが明らかされた。今後の展開として、miR-30e の発現が胆管癌のステージや予後を決定する一因子となる可能性があると同時に、EVs を介して miR-30e を投与することによる胆管癌の新たな治療標的としての活用が期待される。			
申請者に対して、論文内容、関連領域について各委員から多数の試問がなされたが、これに対して丁寧かつ真摯に科学的な回答で対応しており、関連分野において広い知識を有していると判断した。本審査委員会では慎重な意見交換を行い、本論分は申請者が積み重ねた努力の結果であり、学術的にも充分貢献したことを認め、学位を授与する価値があると結論づけた。			